

B1

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-302922

(43)公開日 平成5年(1993)11月16日

| (51)Int. Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|----------|-----|--------|
| G 0 1 N 33/50 | T | 7055-2 J | | |
| A 6 1 B 5/20 | | 8932-4 C | | |
| 10/00 | U | | | |
| G 0 1 N 33/53 | D | 8310-2 J | | |
| 33/543 | A | 9217-2 J | | |

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 15 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-------------|----------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平4-105214 | (71)出願人 | 000100492 わかもと製薬株式会社 東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号 |
| (22)出願日 | 平成4年(1992)4月1日 | (72)発明者 | 鈴木 宏和 神奈川県三浦郡葉山町堀内495番地の1 |
| (31)優先権主張番号 | 特願平3-148080 | (72)発明者 | 櫻井 美典 神奈川県相模原市若松5丁目15番地12号 |
| (32)優先日 | 平3(1991)5月24日 | (72)発明者 | 大橋 良民 神奈川県秦野市南が丘5丁目3番地44号 |
| (33)優先権主張国 | 日本 (J P) | (72)発明者 | 後藤 正義 神奈川県伊勢原市東成瀬4番地2号5の408 |

(54)【発明の名称】 腎疾患の診断法

(57)【要約】

【目的】 ヒト尿中のヒトアルブミン分解物を検出することによって早期に腎疾患の診断方法を提供する。

【構成】 健常人と腎疾患患者との尿中のヒトアルブミン分解物を検出するにあたり被検者の尿を

- 1) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、
- 2) 等電点ゲル電気泳動法、
- 3) セルロースアセテート膜電気泳動法、
- 4) 高速液体クロマトグラフ法

により分離を行い、それぞれを免疫転写法もしくは免疫直接発色法あるいはアフィニティークロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーの組合せによる紫外吸収スペクトルの検出でヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物を特異的に検出することによって早期の腎疾患を診断する。

【効果】 本発明の方法によって従来に比べ早期の腎疾患に対する診断が可能となる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト尿中のアルブミン分解物を検出することによる腎疾患の診断方法。

【請求項2】 上記ヒト尿中のアルブミン分解物の検出が電気泳動を用いた免疫学的分析方法である請求項1記載の方法。

【請求項3】 上記ヒト尿中のアルブミン分解物の検出がヒト尿をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動または等電点ゲル電気泳動により、ヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物とに分離し、ゲル中のヒトアルブミン分解物を転写用支持体に転写固相化し、該固相化支持体に一次抗体として抗ヒトアルブミン抗体を反応させた後、酵素を標識した2次抗体を反応させ、しかる後、酵素の検出試薬を用いてヒトアルブミン分解物を着色させることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】 上記ヒト尿中のアルブミン分解物の検出がヒト尿をセルロースアセテート膜上で電気泳動を行うことにより、ヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物とに分離し、膜上のアルブミン分解物を直接または転写用支持体に固相化し、該固相化支持体に一次抗体として抗ヒトアルブミン抗体を反応させた後、二次抗体としてビオチン抗IgG抗体を反応させ、さらに酵素標識したアビジンを反応させ、しかる後に酵素の検出試薬を用いてヒトアルブミン分解物を着色させることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項5】 上記ヒト尿中のアルブミン分解物の検出が液体クロマトグラフィーを用いた分析方法である請求項1記載の方法。

【請求項6】 上記ヒト尿中のアルブミン分解物の検出がアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルフィルトレーションを用いた分析方法である請求項5記載の方法。

【請求項7】 アフィニティークロマトグラフィーのリガンドが抗ヒトアルブミン抗体である請求項5記載の方法。

【請求項8】 ゲルフィルトレーションに用いる担体が蛋白質の分離分析に用いられるものである請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は腎疾患の診断方法に関するものである。更に詳しくはヒト尿中のアルブミン分解物の検出による腎疾患の診断方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術ならびに発明が解決すべき問題点】 腎症、特に糖尿病性腎症は腎生検が困難なことから持続性蛋白尿、腎機能障害、高血圧等の知見から臨床診断がなされてきた。しかし、蛋白尿が出現すると治療が難しく、5～6年経過で末期腎不全に陥るのが通例である。そのため、通常の尿試験紙法で尿蛋白が陽性となる前に腎病変

を診断して早期治療を行なうことが臨床医学の立場から強く望まれている。この目的で開発されたのが尿中アルブミンの微量測定法であり、近年腎症の診療にとって必須の検査法になりつつある。

【0003】 尿中の微量アルブミンはRIA（ラジオイムノアッセイ）や免疫沈澱法により、正確に定量できるが、最近簡易キットが市販されており、アルブシュー（エーザイ株式会社）もその一つである。これは免疫凝集阻止反応を原理としており、試薬はアルブミン感作ラテックスとアルブミン抗体であり、尿中にアルブミンが殆どなければ抗原抗体反応でラテックスが凝集するが、尿中にアルブミンがあればこれを妨害して凝集が阻止される。

【0004】 このように微量のアルブミンを測定することにより腎疾患を診断する方法はあるが、さらに早期に腎症の診断ができるものはない。すなわち、Mogensenら（*N. Engl. J. Med.*, 310, 356, 1984）の分類によると、微量アルブミン尿は糖尿病発症6～20年の早期腎症の時期であり、第四期（顕性腎症）へ移行する危険性が大きいのでさらに前期の腎症の診断の手法を開発することが望まれている。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは腎症の早期診断に役立つ検査法について鋭意検討した結果、ヒト尿中のアルブミン分解物に着目し、これを電気泳動法とイムノブロット法による検出、さらには液体クロマトグラフィーなどを用いて分離、分析することに成功し、従来公知の早期腎症診断法に比べ、はるかに早期に腎症を発見できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 本発明におけるヒトアルブミン分解物とはヒトアルブミンが酵素などにより生体内で分解され、本来の分子量約69,000が低分子化されたものすべてが実質的に対象となる。ヒトアルブミン分解物の存在は分子量の差異または、荷電状態の差異を利用してヒトアルブミンと分離し、抗原抗体反応を行なうことにより検出することができる。

【0007】 ヒトアルブミン及びヒトアルブミン分解物の検出には、特異的な抗原抗体反応を利用するのが一般的であり、これらの免疫学的手法としてはEIA（エンザイムイムノアッセイ）法、RIA法、イムノブロット法などがあるが、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法やセルロースアセテート膜電気泳動法、さらには等電点ゲル電気泳動法などの組合せを考慮すると操作性、迅速性などの面からイムノブロット法が最適である。

【0008】 一方、近年液体クロマトグラフィーによる生体成分の分析の進歩はめざましく、特に高速液体クロマトグラフィーにおいては、カラムの理論段数の増大、定量ポンプの改良や検出器などの向上により、さらには全自動化を完遂させるためのオートサンブラー、オート

インジェクターシステムなどの技術が集大成されるに至り、昼夜を問わず稼動することが可能になってきた。

【0009】特に臨床検査の分野では、より精度が高く、より早い分析が望まれ、例えば糖尿病患者における過去1〜2ヶ月間の血糖値の推移の指標とされているヘモグロビンA_{1c}などの分析にはこの高速液体クロマトグラフィーは今や不可欠の分析機器になりつつある。

【0010】高速液体クロマトグラフィーを含めた液体クロマトグラフィーを尿中のアルブミン分解物の分離分析に応用する場合、尿中には複雑かつ多種類の生体成分が存在するため同一カラムで一挙に分離することも可能であるが、分離カラムの効率を向上させるためには尿中のアルブミンおよびアルブミン分解物のみを選択的にポストカラム（前カラム）に吸着せしめた後、溶離液で溶出して本カラムである分離カラムで各アルブミン分解物を分離分析することも可能である。以下にヒトアルブミン分解物を分離分析する方法について、詳細に説明するが本方法はその基本技術の一端を紹介するものであって、これらに限定されるものではない。

【0011】〔SDSポリアクリルアミド電気泳動法〕（以下SDS-PAGE法と略す。）

SDS-PAGE法にはShapiroら（*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815, 1967）とWeberら（*J. Biol. Chem.*, 244, 4406, 1969）によって報告された連続緩衝液法やLaemmli（*Nature*, 227, 680, 1970）によって報告された不連続緩衝液法などがあり、いずれの方法でも使用することができるが、分離が優れているLaemmliの方法が最も好ましい。

【0012】また、分離ゲルの濃度については通常5%〜12.5%位が使用されているが、ヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の分離が可能であれば特に規定する必要はない。さらに、ディスク泳動法およびスラブ泳動法があり、いずれの方法も用いることができるが、スラブ泳動法が好ましい。イムノブロット法はヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物を支持体へ転写後、抗原抗体反応により発色させる。

【0013】すなわち、SDS-PAGE法でヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物を分離した後、ゲル中の各タンパク質を速やかにニトロセルロース膜に転写し、拡散することなく膜に吸着せしめる。膜上のタンパク質は拡散することがないので、その後の処理は時間をかけて行なうこともできる。次に1次抗体（本発明においては抗ヒトアルブミン抗体を示す）を反応させ、洗浄後、酵素を標識した2次抗体と反応させる。さらに洗浄後、酵素の検出試薬を添加することにより存在の有無を確認する。

【0014】転写方法には様々な方法があり、その中でもTowbinらの方法（*Proc. Natl. Aca*

d. Sci., 76, 4350-4354, 1979）が最適である。転写に用いる支持体としてはニトロセルロース、アミノフェニルチオエーテルペーパー、アミノベンジルオキシメチルペーパー、ジアミノエチルセルロースなどが使用できるが、特にニトロセルロース膜が最適である。ニトロセルロース膜はBA85（Schleicher & Schuell社製）HAHY（Millipore社製）として市販されている。なお、SDSポリアクリルアミドゲルおよび泳動装置、ニトロセルロース膜および転写装置についてはテフコ株式会社で一式市販されているのでこれを用いると好都合である。

【0015】ニトロセルロース膜上で抗原抗体反応を行なう場合には、非特異反応を抑制するためウシ血清アルブミン（BSA）、スキムミルクなどを用いるが、好ましくは抗ヒトアルブミン抗体と交差反応性の可能性が少ないスキムミルクが適している。抗ヒトアルブミン抗体は家兎に免疫して容易に得ることができるが、市販品を使用することもできる。さらに好ましくは非特異反応を防止するために純度の高い抗体を用いるのが好ましい。高純度にするには、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによる精製などを行なう。

【0016】2次抗体は抗ヒトアルブミン抗体を作出した動物種により異なるが、通常はウサギ、ヤギ、マウスなどのIgGに対する抗体が用いられる。さらに好ましくは抗ヒトアルブミンの場合と同様に非特異反応を防止するために精製を行なう。酵素標識物に用いる酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどが使用できるが、好ましくは純品が入手しやすく、活性検出法が確立されているペルオキシダーゼが適している。

【0017】なお2次抗体に酵素を標識する方法にはグルタルアルデヒド法（S. Arrameas, *Immunochemistry*, 6, 43, 1969）や過ヨウ素酸酸化法（P. K. Nakane, A. Kawaoi, *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 1084, 1974）などがあり容易に標識物を作製することができる。また、酵素標識した2次抗体はCappel社などでも市販されており、容易に入手することができる。

【0018】酵素の検出試薬としては、ペルオキシダーゼには過酸化水素水とジアミノベンチジンあるいはクロロナフトール、アミノエチルカルバゾールなどが利用できるが、過酸化水素水とジアミノベンチジンの組合せが適している。一方、アルカリフォスファターゼの場合には、β-ナフチルリン酸、プロモクロロインドリルリン酸、ウンベリフェニルリン酸などが用いられる。さらに、グルコースオキシダーゼではD-グルコースが用いられる。

【0019】以下に本診断法の概要について示す。まず、尿中の蛋白質を可溶化する。すなわち、尿中に存在

10

20

30

40

50

する蛋白質分解酵素を失活させるとともに、SDSと β -メルカプトエタノールによって蛋白質を効果的に変性させる目的で沸騰水中で一定時間熱処理する。次に可溶化した尿をSDS-ポリアクリルアミドスラブゲルの各レーンに一定量注入し、SDSを含むグリシン-トリス緩衝液を泳動用緩衝液として、定電流で一定時間泳動させる。

【0020】泳動後、ゲルをあらかじめ冷却しておいたメタノールを含むグリシン-トリス緩衝液（転写用緩衝液）に一定時間浸漬し、平衡化する。ゲルを陰極側、転写用支持体を陽極側としてブロッティング装置に装着する。転写槽には転写用緩衝液を加え、氷冷下、定電圧で一定時間転写を行なう。転写後、Tween 20を含むリン酸生理緩衝液（PBS）で転写用支持体を洗浄し、スキムミルクを含むPBSで一定時間、一定温度でマスキングを行なう。

【0021】次に、抗ヒトアルブミン抗体をBSAを含むPBSにて希釈し、一定温度で一定時間反応させる。さらに、反応後Tween 20を含むPBSで洗浄し、あらかじめBSAを含むPBSにて一定濃度に希釈した酵素標識二次抗体を一定温度で一定時間反応させ、ヒトアルブミン分解物の検出を行なう。

【0022】〔等電点ゲル電気泳動法〕一般の電気泳動はある特定のpHにおける電解質の荷電状態の差を利用しているのに対し、等電点ゲル電気泳動法は両性電解質がある値のpHにおいて、その実効電荷が0となり、泳動しなくなるのを利用して、pH勾配をもったメEDIUM中で泳動し、等電点の値に従ってタンパク質を分離しようとするものである。

【0023】pH勾配を作る担体としては両性電解質（両性担体Carrier ampholytes）により容易にできる。両性担体はVestbergら（*Acta. Chem. Scand.*, 20, 820-834, 1966）によって開発されたものであるが、最近、商品名Pharmalyte（ファルマシア社製）など数社より市販されている。

【0024】等電点ゲル電気泳動に用いる支持体としては（電気透過のないことが条件であるが、この条件を満たすものとして）ポリアクリルアミドゲルがあげられる。このゲルは通常、分子ふるい作用を有するが、等電点ゲル電気泳動に用いる場合には分子ふるい効果は逆に分離を悪くするため、通常5%あるいはそれ以下のゲルとして使用することが好ましい。

【0025】両性担体を含むゲルの作製については、種々の実験書に述べられているが例えば、口野嘉幸、平井久丸、櫻林郁之介（実験操作ブロッティング法、239-241、ソフトサイエンス社、1987）らの方法が参考になる。また市販品としてIEF PAGE mini（登録商標）（テフコ株式会社）を利用することもできる。これらの市販品はスラブゲルとなっており、多

数検体を処理するのに適している。

【0026】また、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動の条件は特に限定されるものではないが、電極液として通常、陰極液には0.1~1.0M水酸化ナトリウム、陽極液には0.01~1Mリン酸が用いられる。検体は両性担体とグリセロールを含む液で溶解し、試料液として用いる。泳動電圧は100~500V程度に変化させて行なうのが好ましい。

【0027】泳動を終えた各種担体を転写する場合例えば、転写に用いる支持体としてはニトロセルロース膜、アミノフェニルチオエーテルペーパー、アミノベンジルオキシメチルペーパー、ジアミノエチルセルロースなどが使用できるが、特にニトロセルロース膜が最適である。ニトロセルロース膜はBA85（Schleicher & Schuell社製）HAHY（Millipore社製）として市販されている。

【0028】なお、泳動を終えた等電点ゲルからの転写はTowtlinらの方法（*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350-4354, 1979）に準じて行なう。この場合、ブロッティング緩衝液には0.5~1.0%酢酸を用い、ゲルと膜のセットは逆に膜を陰極側に装着する。通電下で転写された例えばニトロセルロース膜などの支持体上で特異的にヒトアルブミン分解物を検出するには、SDS-PAGE法で用いた方法と同様の操作を行えば検出が可能である。

【0029】例えば、ニトロセルロース膜上に転写を終えた膜をBSAやスキムミルクなどでマスキング後、抗ヒトアルブミン抗体を反応せしめ、さらに酵素標識抗体を作用させ、発色剤例えば過酸化水素水とジアミノベンチジンなどを用いてヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物を発色せしめ、検出することができる。以下に、等電点ゲル電気泳動、転写および発色法について、より具体的に説明するが、本方法は1例であって、この方法に限定されるものではない。

【0030】すなわち、等電点電気泳動、転写および発色法については、まず被検者の尿の一定量に両性担体とグリセロールを加え、試料液とする。次に試料液を両性担体を含むポリアクリルアミドスラブゲルの各レーンに一定量を注入し、泳動用緩衝液として陰極側に水酸化ナトリウム溶液、陽極側にリン酸溶液を加え、一定時間泳動させる。

【0031】泳動後、ゲルをあらかじめ冷却しておいた酢酸溶液に一定時間浸漬し、平衡化する。転写用支持体を陰極側、ゲルを陽極側としてブロッティング装置に装着する。転写槽には酢酸溶液を加え、氷冷下、定電圧で一定時間転写を行なう。転写後、Tween 20を含むPBSで転写用支持体を洗浄し、スキムミルクを含むPBSで一定時間、一定温度でマスキングを行なう。次に抗ヒトアルブミン抗体をBSAを含むPBSにて希釈し、一定温度で一定時間反応させる。反応後、Twee

n20を含むPBSで洗浄し、あらかじめBSAを含むPBSにて一定濃度に希釈した酵素標識二次抗体を一定温度で一定時間反応させ、ヒトアルブミン分解物の検出を行なう。

【0032】〔セルロースアセテート膜電気泳動法〕この方法はセルロースアセテート膜上に被検者の尿検体を塗布し、電気泳動を行った後、ニトロセルロース膜に泳動を完了したセルロースアセテート膜を転写するか、セルロースアセテート膜上の蛋白質を直接固定化した後、抗原抗体反応を行い、選択的にヒトアルブミン分解物の検出を行うものである。一般にセルロースアセテート膜は、セルロースの水酸基の一部ないし全部がアセチル基で置換されたもので均質な細孔をもった膜にしたものである。この膜は濾紙などの支持体と比較して次のような利点がある。

【0033】すなわちa. 薄く均質な多孔性の膜、b. 微量の検体で行える、c. 泳動時のテーリング現象がほとんどない、d. 各成分の分離が明瞭である、などの特徴がある。特に各成分の分離が短い泳動距離で十分に達成できることなどの利点を有しているので泳動時間の短縮および支持体の狭小化を可能とし、その結果泳動装置をより小型化し、ひいては多数の検体を同時に処理し自動化することが可能となる。セルロースアセテート膜電気泳動法は血清タンパク分画法などの日常検査の中でもスクリーニング試験の1つとして広く利用されている。

【0034】本法に用いるセルロースアセテート膜および電気泳動装置は通常使用されているものでよい。セルロースアセテート膜は各種市販されているが、タイタンIII（ヘレナ研究所社製）は裏面をプラスチック板でラミネートされているので強度的に好適である。

【0035】セルロースアセテート膜電気泳動の条件は特に限定されるものではないが、泳動用緩衝液としては一般に血清タンパク分画法に用いられるペロナール緩衝液（pH8.6）も使用できるが、より明確な分離を行なうには0.2～0.4Mトリス-グリシン緩衝液（pH9.0～9.2）が好適である。検体塗布量は幅1cm当り、一般的には、0.4～1.2μlとされているが、ヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の分離が可能であれば特に規定する必要はない。通電条件についても通常行われている方法であれば問題ないが、50～200V程度の電流を選択するのが望ましい。

【0036】泳動を完了したセルロースアセテート膜からの転写方法は通常ニトロセルロース膜のごとき支持体を重ね合せ、室温で数分間圧着しておくことで達成される。なお、転写に用いる支持体はSDSポリアクリルアミドゲル又は等電点ゲルに用いられるものと同様の製品でよい。また、泳動を完了したセルロースアセテート膜に蛋白質変性剤を加え、直接固定化することもできる。

【0037】ニトロセルロース膜またはセルロースアセテート膜上で抗原抗体反応を行なう場合には非特異反応

を抑制する必要があるが、この方法はSDS-PAGE法および等電点ゲル電気泳動法と同様の方法でよい。セルロースアセテート膜電気泳動では試料の添加量が少ないため、抗原抗体反応の感度をさらに上げる必要がある。

【0038】検出感度を上げる方法としては種々あるが、アビジン-ビオチン法が適している。すなわち、抗ヒトアルブミン抗体を反応させた後、2次抗体にビオチンを結合させたビオチン化2次抗体を反応させ、さらに酵素標識アビジンを反応させる方法である。ビオチン化抗体はCappel社、酵素標識アビジンはZymed社などで市販されており容易に入手することができる。またアビジン、ビオチン以外の抗ヒトアルブミン抗体、酵素の検出試薬についてはSDS-PAGE法、等電点ゲル電気泳動法で用いたものでよい。

【0039】以下にセルロースアセテート膜の電気泳動、転写および発色法について例示するが、本例は1例であって、これに限定されるものではない。すなわち、セルロースアセテート膜の電気泳動、転写および発色法については、まず被検者の尿の一定量をアプリークーターでセルロースアセテート膜に塗布を行う。なお、セルロースアセテート膜は泳動用緩衝液であらかじめ平衡化しておく。

【0040】市販の泳動装置に装着し、陽極側にトリス-グリシン緩衝液、陰極側にバルビタールナトリウム-ホウ酸緩衝液を加え、泳動を定電圧で行う。泳動後、あらかじめメタノールを含むグリシン-トリス緩衝液で平衡化したニトロセルロース膜にセルロースアセテート膜を数分間圧着する。ヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物が転写されたニトロセルロース膜に抗ヒトアルブミン抗体を一定温度で一定時間反応させる。

【0041】界面活性剤を添加したPBSでニトロセルロース膜を洗浄し、ビオチン化した抗IgG抗体を一定温度で一定時間反応させる。さらに洗浄を行った後、酵素標識アビジンを一定温度で一定時間反応させる。洗浄後、発色剤により発色を行ないヒトアルブミン分解物の有無を確認する。次に、セルロースアセテート膜上で泳動後、ヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物を直接固定化したのちに発色せしめヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物のみを特異的に検出する方法について例示するが、本例はその1例であってこれに限定されるものではない。

【0042】被検者の一定量の尿をアプリークーターでセルロースアセテート膜に塗布を行う。なお、セルロース膜は泳動用緩衝液であらかじめ平衡化しておく。市販の泳動装置に装着し、陽極側にトリス-グリシン緩衝液、陰極側にバルビタールナトリウム-ホウ酸緩衝液を加え、泳動を一定の電圧で行う。泳動後、セルロースアセテート膜にトリクロロ酢酸-スルホサリチル酸液を加え、ヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の固定

を行う。その後、純水で洗浄して抗ヒトアルブミン抗体を一定温度で一定時間反応させる。界面活性剤を添加したPBSでセルロースアセテート膜を洗浄し、ビオチン化した抗IgG抗体を一定温度で一定時間反応させる。さらに洗浄を行った後、酵素標識アビジンを一定温度で一定時間反応させる。洗浄後、発色剤により発色を行ないヒトアルブミン分解物の有無を確認する。

【0043】〔液体クロマトグラフィー〕液体クロマトグラフィーの手法には、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、パーティションクロマトグラフィー、ゲルフィルトレーションクロマトグラフィーさらにはアフィニティークロマトグラフィーなどがあるが、尿中のアルブミン分解物の分離分析にはこれらの液体クロマトグラフィーの手法を単独もしくは各種液体クロマトグラフィーの組合せで達成することができる。本発明においてはアフィニティークロマトグラフィーとゲルフィルトレーションクロマトグラフィーの組合せの例を示すが、これに限定するものではない。

【0044】まず、被検者の尿中よりヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の混合物を得るためには、抗ヒトアルブミン抗体を結合した担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーが有利に利用できる。担体への抗体の結合は通常アガロースのような多糖類をハロゲン化シアン、特にシアノジェンブロマイド(BrCN)で処理して得られる活性化アガロースに蛋白質のアミノ基を介して共有結合させる方法が一般に利用されている。(Axen, R., Porath, J. & Ernback, S. *Nature*, 214, 1302, 1967)

【0045】アフィニティークロマトグラフィーに用いる担体としては種々の多糖類などが報告され、担体と抗体の結合は容易になされる。例えば、セファロース4B(ファルマシア社製)をアルカリ条件(pH11-12)下でBrCNと反応せしめ、BrCN活性化セファロース4Bを作製する。タンパク質溶液、この場合には抗ヒトアルブミン抗体などを通常pH8-10の条件下で加え、攪拌することにより目的のアフィニティークロマト用担体を得ることができる。

【0046】BrCNは毒物であるので、CNBr-activated Sepharose 4B(登録商標)(ファルマシア社製)を用いれば容易にタンパク質、この場合には抗ヒトアルブミン抗体などをカップリングさせることができる。さらに近年、高速液体グラフィー用の活性化型担体も市販され、利用することができる。すなわち親水性ポリマーを利用したTSKgel G5000PW(東ソー社製)にトレシル基を導入したTSKgel Tresyl-5PW(東ソー社製)があり、これは蛋白質分子の一般アミノ基あるいはチオール基と反応する担体である。

【0047】リガンド部分に使用するタンパク質例えば、抗ヒトアルブミン抗体はいずれの動物種で得られた

ポリクロナール抗体、またはモノクロナール抗体でも可能であり、自家調製でも容易に得ることができる。この場合にはヒトアルブミンを家兎に免疫して得られた抗血清をアフィニティークラム(ヒトアルブミン-セファロース4B)で精製することによりさらに純度のすぐれた抗ヒトアルブミン抗体を得ることができる。アフィニティークロマトグラフィーにより得られるヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の混合物はゲルフィルトレーションクロマトグラフィーによりヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物に分離分析することが可能である。

【0048】一方、通常のセファデックス(ファルマシア社製)などの担体をゲルフィルトレーションクロマトグラフィーに用いることは可能であるが、サンプルが多量に必要なこと、操作時間が長いことおよび再現性などの点で問題となることもあり、通常余り好ましいとは言えない。一方、高速液体クロマトグラフィーは短時間にかつ、少量のサンプルで分離分析を行なうことができ、さらに再現性にすぐれているなどの利点を有している。通常蛋白質の高速液体クロマトグラフィーの充填剤としてはTSKgel(東ソー社製)、CPG-10(Electro-Nucleonics社製)、Protein column I-125(Waters社製)などが市販されているが、この中でもTSKgelは分子量からみて種々の排除限界を有する担体が揃っており、担体への非特異的吸着が非常に弱く、タンパク質の分離および分析には好適である。特に、TSKgel G3000SW, TSKgel G3000SWxLおよびTSKgel G2000SW, TSKgel G2000SWxLは分子量からみてそれぞれの排除限界は500KDa, 100KDaであり、ヒトアルブミン(分子量69,000)とヒトアルブミン分解物の分離には両カラムが適している。

【0049】次に測定法の概要を示すが本法はその1例であってこれに限定されるものではない。被検者の一定量の尿サンプルを抗ヒトアルブミン結合担体に吸着させ洗浄後、酸性下で溶出を行いヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物を得る。得られた混合液を直接、高速ゲルフィルトレーションクロマトグラフィーに付し、溶離パターンを紫外部(A280nm)の吸収により求める。なお、検出感度をさらに向上させたい場合にはアフィニティークロマトグラフィーの溶出液にFITCなどの蛍光物質を結合させ高速ゲルフィルトレーションクロマトグラフィーの溶離パターンを蛍光強度で求めることもできる。

【0050】

【実施例】次に実施例をもってさらに具体的に本発明を説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

【実施例1】

尿中のヒトアルブミン分解物のSDS-PAGE法によ

る検出(SDS-PAGE法)

尿の可溶化: 2% SDS、2% 2-メルカプトエタノール、40% グリセリンを含む20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) に尿を等量加え5分間沸騰浴中で可溶化した。

電気泳動: Laemmli の方法に準じて行なった。

濃縮ゲル4%、分離ゲル12%のポリアクリルアミドゲル (商品名 SDS-PAGE mini、テフコ株式会社製) を用いた。各レーンに可溶化した被検尿を10 μ l 注入した。泳動用緩衝液は0.1% SDSを含む380 mM グリシン-50 mM トリス緩衝液 (pH 8.3) を用い、泳動は20 mA で1.5時間行なった。

【0051】(イムノブロット法)

転写: 泳動後のポリアクリルアミドゲルを Towbin の方法により、ニトロセルロース膜 (テフコ株式会社製) に転写した。すなわち、泳動後のゲルをあらかじめ冷却しておいた転写用緩衝液 (20% メタノールを含む190 mM グリシン-25 mM トリス緩衝液 pH 8.3) に30分間浸漬し、平衡化する。ポリアクリルアミドゲルを陰極側、ニトロセルロース膜を陽極側としてブロッキング装置に装着する。転写槽にはあらかじめ冷却した転写用緩衝液を入れる。転写は氷冷下42 V、2時間で行なった。

【0052】ヒトアルブミンの検出: 転写後、0.05% Tween 20-PBS (pH 7.2) でニトロセルロース膜を3回洗浄後、3% スkimミルク/PBSにて4℃で1晩マスキングした。次にウサギ抗ヒトアルブミン血清 (MBL社製) を1% BSA/PBSにて1:200に希釈し、室温で1時間反応させた。反応後0.05% Tween 20-PBSで3回洗浄し、1% BSA/PBSにて1:400に希釈したHRPO抗ウサギIgG抗体 (Cappel社製) と室温で1時間反応させた。洗浄後、0.007% 過酸化水素水と0.025% 3,3'-ジアミノベンチジンを含む0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) (尾形研二、他、臨床病理、31, 215, 1983) にて発色させた。反応停止は蒸留水により行ない、ヒトアルブミン分解物の有無を確認した。健常者について行なったところ、ヒトアルブミン (分子量69,000) にのみにバンドが検出され、ヒトアルブミン分解物の存在は認められなかった。

【0053】【比較例1】健常者5名、IgA腎症の患者9名、糖尿病性腎症の患者4名、糖尿病患者9名の尿について各々実施例1と同様の操作でヒトアルブミン分解物の検出を行なった。図1に健常者尿のイムノブロットパターンの結果を示す。健常者5名はすべてヒトアルブミン (分子量69,000) に由来する1本のバンドしか検出されなかった。図2にIgA腎症患者尿のイムノブロットパターンの結果を示す。IgA腎症の患者ではヒトアルブミン以外にさらに低分子域にヒトアルブミ

ン分解物が6名すべて検出された。図3に糖尿病性腎症患者尿のイムノブロットパターンの結果を示す。糖尿病性腎症の患者ではヒトアルブミン以外にさらに低分子域にヒトアルブミン分解物が4名すべてに検出された。図4に糖尿病患者尿のイムノブロットパターンの結果を示す。糖尿病患者9名のうち、6名にヒトアルブミン以外にさらに低分子域にヒトアルブミン分解物が検出された。

【0054】【比較例2】比較例1で使用した尿サンプルを用いて微量アルブミンの検出を行ない、本法との感度における比較を行なった。なお、微量アルブミンの検出にはアルブシューア (エーザイ株式会社) を用いた。表1に結果を示す。

【0055】【実施例2】尿中のヒトアルブミン分解物の等電点電気泳動法による検出

ヒト尿を下記に示すサンプルバッファーで5倍に希釈した。[サンプルバッファー: Servalyt (Serva社) pH 3-10, 0.2 ml、グリセロール3.0 mlを蒸留水で10 mlとしたもの。]

上記で調製した尿試料液をIEF PAGE mini pH 3-10 (テフコ社製) のレーンに10 μ l 注入した。泳動緩衝液は陰極側に0.05 M NaOH、陽極側に0.01 M H₂PO₄を用い、100 V 30分、200 V 30分、500 V 60分と段階的に電圧をかけて泳動を行なった。泳動後、ゲルをあらかじめ冷却しておいた0.5% 酢酸に30分浸漬し平衡化した。ニトロセルロース膜 (S&S社製) をブロッキング装置の陰極側にポリアクリルアミドゲルを陽極側に装着した。転写槽にはあらかじめ冷却した0.5% 酢酸を入れ、転写は氷冷下42 V、2時間で行なった。

【0056】転写後、0.05% Tween 20-PBS (pH 7.2) でニトロセルロース膜を3回洗浄後、3% スkimミルク/PBSにて4℃、1晩マスキングした。次にウサギ抗ヒトアルブミン血清 (MBL社製) を1% BSA/PBSにて1:200に希釈し、室温で1時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20-PBSで3回洗浄し、1% BSA/PBSにて1:400に希釈したHRPO抗ウサギIgG抗体 (Cappel社製) と室温で1時間反応させた。洗浄後、0.007% 過酸化水素水と0.025% 3,3'-ジアミノベンチジンを含む0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) (尾形研二、他、臨床病理、31, 215, 1983) にて発色させた。発色後、蒸留水で洗浄しヒトアルブミン分解物の有無を確認した。なお、健常者の尿について行なったところ、対照のヒトアルブミン (分子量69,000) と移動度が同じ等電点 (以下pIと略す) 4.0付近に単一バンドとして検出された。

【0057】【比較例3】健常者1名、糖尿病患者2名、糖尿病性腎症の患者1名について等電点電気泳動

写法にて検出を行なった。その結果を図5に示す。健常者および糖尿病患者1についてはヒトアルブミン(分子量69,000)に由来するバンドがpI 4.0付近に単一バンドとして認められたが、糖尿病患者2および糖尿病性腎症の患者についてはpI 5~7付近にヒトアルブミン分解物が数本から十数本のバンドとして認められた。

【0058】〔実施例3〕

セルロースアセテート膜からの転写発色法を用いた尿中のヒトアルブミン分解物の検出

(電気泳動操作) 0.34Mトリス-グリシン緩衝液(pH9.1)にて平衡化したセルロースアセテート膜(商品名タイタンIII-ZZ、ヘレナ研究所社製)に尿サンプルをアプリーケーター(商品名スーパーZアプリーケーター、ヘレナ研究所社製)を用い、約1μlを塗布した。泳動用緩衝液は陽極側に0.34Mトリス-グリシン緩衝液(pH9.1)、陰極側に0.05Mバルビタールナトリウム-ホウ酸緩衝液(pH8.9)(商品名エレクトラACバッファー、ヘレナ研究所社製)を用い、泳動条件は100Vで45分間で行った。

【0059】(転写操作) 泳動後のセルロースアセテート膜をニトロセルロース膜に転写するにあたり、泳動後のセルロースアセテート膜に20%メタールを含む0.19Mグリシン-0.025Mトリス緩衝液(pH8.3)で平衡化したニトロセルロース膜を圧着し、室温で5分間転写を行った。

【0060】(発色操作) ウサギ抗ヒトアルブミン抗体(MBL社製)を1%BSA/PBSにて1:400に希釈し、室温で30分反応させた。反応後、0.05%Tween20-PBSで3回洗浄し、1%BSA/PBSにて1:2000に希釈したビオチン抗ウサギIgG抗体(Cappel社製)と室温で30分間反応させた。次に0.05%Tween20-PBSで洗浄後、streptavidin-HRPO(Zymed社製)を1%BSA/PBSにて1:1000に希釈し、室温で30分間反応させた。反応後、0.05%Tween20-PBSで洗浄を行い、0.007%過酸化水素水と0.025%3,3'-ジアミノベンチジンを含む0.05Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)にて発色させた。発色後、純水で洗浄しヒトアルブミン分解物の有無を確認した。健常者の尿について行ったところ、対照のヒトアルブミン(分子量69,000)と移動度が同じ単一バンドで検出され、ヒトアルブミン分解物の存在は認められなかった。

【0061】〔実施例4〕

セルロースアセテート膜上での直接固定化発色法による尿中のヒトアルブミン分解物の検出

(電気泳動操作) 0.34Mトリス-グリシン緩衝液(pH9.1)にて平衡化したセルロースアセテート膜(商品名タイタンIII-ZZ、ヘレナ研究所社製)に被

検尿をアプリーケーター(商品名スーパーZアプリーケーター、ヘレナ研究所社製)を用い、約1μl塗布した。泳動用緩衝液は陽極側に0.34Mトリス-グリシン緩衝液(pH9.1)、陰極側に0.05Mバルビタールナトリウム-ホウ酸緩衝液(pH8.9)(商品名エレクトラACバッファー、ヘレナ研究所社製)を用い、泳動条件は100Vで45分間行った。

【0062】(タンパク質の固定化操作) 泳動終了後、5%トリクロロ酢酸-5%スルホサリチル酸液でセルロースアセテート膜上のタンパク質を固定し、蒸留水で3回洗浄した。

【0063】(発色操作) ウサギ抗ヒトアルブミン抗体(MBL社製)を1%BSA/PBSにて1:400に希釈し、室温で30分反応させた。反応後、0.05%Tween20-PBSで3回洗浄し、1%BSA/PBSにて1:2000に希釈したビオチン抗ウサギIgG抗体(Cappel社製)と室温で30分反応させた。次に0.05%Tween20-PBSにて洗浄後、streptavidin-HRPO(Zymed社製)を1%BSA/PBSにて1:1000に希釈し、室温で30分反応させた。反応後、0.05%Tween20-PBSにて洗浄を行い、0.007%過酸化水素水と0.025%3,3'-ジアミノベンチジンを含む0.05Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)にて発色させた。発色後、蒸留水で洗浄してヒトアルブミン分解物の有無を確認した。健常者の尿について行ったところ、対照のヒトアルブミン(分子量69,000)と移動度が同じ単一バンドで検出され、ヒトアルブミン分解物の存在は認められなかった。

【0064】〔比較例4〕 健常者1名、糖尿病患者2名、糖尿病性腎症の患者1名について、各々の尿を先の実施例3、4で記載した方法すなわち、セルロースアセテート膜からの転写発色法およびセルロースアセテート膜上での直接固定化発色法を用い、それぞれの泳動パターンの比較を行った。その結果を図6にセルロースアセテート膜からの転写発色法でのイムノブロットパターンを示す。健常者および糖尿病患者1についてはヒトアルブミン(分子量69,000)に由来する単一バンドのみが検出された。一方、糖尿病患者2および糖尿病性腎症の患者では、アルブミン分解物が数多くのバンドとして検出された。一方、図7にセルロースアセテート膜上での直接固定化発色法のイムノブロットパターンの結果を示す。セルロースアセテート膜からの転写発色法と同様の泳動パターンを示したが、拡散または発色などの強弱によりヒトアルブミン分解物の各バンドが巾の広いバンドとして検出された。

【0065】〔実施例5〕

ゲルフィルトレーションクロマトグラフィーによるヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物(BrCN分解)の分離分析

(標品の調製) ヒトアルブミンの標品はクロマトグラフィーによる精製品 (Cappel社製) を用いた。一方、BrCNによるアルブミン分解物はMcMenamyらの方法 (J. Biol. Chem., 246, 4744-4750, 1971) に準じて調製した。すなわち、ヒトアルブミン (フラクションV、シグマ社製) 1gを蒸留水4mlに溶解した後、蟻酸16ml、BrCN 1gを加え、4℃、24時間反応させた。次に、あらかじめ1%プロピオン酸で平衡化したセファデックスG-25 (ファルマシア社製) に付し、280nmの吸収を示す画分を集め、アルブミン分解物800mgを得た。

【0066】 (ゲルフィルトレーションクロマトグラフィー) TSKgel G3000SW (7.5mmφ×60cm) を、pH3.0の0.55Mグリシン-塩酸緩衝液を作り、これにNaClを0.15モルになるように加え、さらにSDSを0.1重量%になるように加え、均一な溶液とし、これを用いて平衡化を行った。ヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物を上記緩衝液で1mg/mlに溶解した。ヒトアルブミン分子にはS-S結合が17個所にわたって存在するため1%2-メルカプトエタノールを加えた試料も別途に調製した。この試料をカラムに100μl注入し、溶離液を流速0.6ml/minで通液し、検出は紫外部 (A280nm) で行った。その結果を図8に示すように、非還元条件下でヒトアルブミンは単一のピークとして示されるが、ヒトアルブミン分解物は4つのピークに分離した。また、還元条件下ではヒトアルブミンは非還元と同様に単一ピークであるがヒトアルブミン分解物は先の4ピークがさらに低分子領域に移動し、還元条件下でのクロ

マトグラフィーの方が分子量の差による分離が明確に示された。

【0067】 【実施例6】

腎症患者尿を用いたアフィニティークロマトグラフィー、ゲルフィルトレーションクロマトグラフィーの組合せによるヒトアルブミン分解物の検出 (その1)

(抗ヒトアルブミン抗体-セファロース4Bの調製法) CNBr-activated Sepharose 4B (登録商標) (ファルマシア社製) 3g (約10mlのゲル) を1mM HCl中で膨潤させ、1mM HCl 500mlで洗浄後、0.5M NaClを含む0.1M NaHCO₃ 溶液 (pH8.3) (以下カップリングバッファーと呼ぶ) 500mlで洗浄を行った。あらかじめカップリングバッファーに溶解したアフィニティークロマトグラフィーで精製したウサギ抗ヒトアルブミン抗体50mgを加え、室温2時間反応させた。その後、カップリングバッファー500mlで洗浄後、0.2Mグリシン溶液、pH8.0 50mlで室温、2時間残存活性基をブロックし、過剰の吸着タンパク質を除去するため、カップリングバッファーと0.5

5Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH3.0) で交互にアフィニティークロマトグラフ用担体を洗浄した。本担体は1mlゲルあたり5mgの抗ヒトアルブミン抗体が結合したものであった。

【0068】 (イムノアフィニティークロマトグラフィー) 尿サンプル (2ml) をあらかじめ5mMホウ酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化した抗ヒトアルブミン抗体-セファロース4B (3ml) に吸着させた。吸着後5倍量の5mMホウ酸緩衝液 (pH8.0) で洗浄し、0.5Mグリシン緩衝液 (pH3.0) にて溶出を行った。紫外部 (A280nm) の吸収を示す画分を集めヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の混合液 (2ml) を得た。

【0069】 (TSKgel G3000SWを用いたアルブミンとアルブミン分解物の分離分析) TSKgel G3000SW (7.5mmφ×60cm) を、pH3.0の0.55Mグリシン-塩酸緩衝液を作り、これにNaClを0.15モルになるように加えさらにSDSを0.1重量%になるように加え、均一な溶液とし、これを用いて平衡化を行った。イムノアフィニティークロマトグラフィーの溶離液 [ヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の混合液 (1ml)] に終濃度0.1%になるようにSDSを加え、その100μlを注入した。溶離液は流速0.6ml/min通液し、検出は紫外部 (A280nm) で行った。

【0070】 (尿サンプル) 健康者1名、糖尿病患者2名、糖尿病性腎症1名、IgA腎症患者1名、SLE患者1名の尿について分析を行った。その結果を図9に示すと、健康者および糖尿病患者1の尿ではヒトアルブミンの単一ピークが認められたが、糖尿病患者尿2ではヒトアルブミンのピークの他にヒトアルブミン分解物のピークが認められた。さらに糖尿病性腎症患者、IgA腎症患者、SLE患者の尿においてもヒトアルブミン分解物が顕著に認められた。

【0071】 【実施例7】

腎症患者尿を用いたアフィニティークロマトグラフィー、ゲルフィルトレーションクロマトグラフ法の組合せによるヒトアルブミン分解物の検出 (その2)

(抗ヒトアルブミン抗体-TSKgel 5PWの調製) TSKgel Tressyl-5PW 0.5gに1.0Mリン酸カリウム2ml、ウサギ抗ヒトアルブミン抗体20mgを加え、三角フラスコで室温16時間振とうしながら固定化を行なった。固定された抗ヒトアルブミン抗体量はゲル1mlあたり9mgであった。この抗ヒトアルブミン抗体-TSKgel 5PW (1.0ml) を10mmφ×20mmにアスピレーターによる減圧下で充填し、高速イムノアフィニティークラムとした。カラムのヒトアルブミン結合量はゲル1mlあたり2mgであった。

【0072】 (抗ヒトアルブミン抗体-TSKgel

5PWを用いたヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の精製) 抗ヒトアルブミン抗体-TSK gel 5PWカラム(10mmφ×20mm)を高速液体クロマトグラフ装置に装着し、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を流速2.0ml/minで洗浄した。尿検体50~100μlを注入し、溶出は0.1Mクエン酸-塩酸(pH1.6)で行い、溶出時間は10分以内で完了した。

【0073】(TSK gel G3000SWを用いたヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の分離) TSK gel G3000SW(7.5mmφ×60cm)を、pH3.0の0.55Mグリシン-塩酸緩衝液を作り、これにNaClを0.15モルになるように加えさらにSDSを0.1重量%になるように加え、均一な溶*

*液とし、これを用いて平衡化を行った。イムノアフィニティークロマトグラフィーの溶離液〔ヒトアルブミンとヒトアルブミン分解物の混合液(2ml)〕をpH3.0に調整し、終濃度0.1%になるようにSDSを加えた試料を100μl注入した。溶離液は流速0.6ml/minで通液し、検出は紫外部(A280nm)で行った。

【0074】(尿サンプル) 健常者1名、糖尿病患者2名、糖尿病性腎症1名、IgA腎症患者1名、SLE患者1名の尿について分析を行ったが、実施例6と全く同様の結果が得られたのでデータは省略した。

【0075】

【表1】

表1 微量アルブミン検出法との比較

| | 検出数(陽性数/検体数) | | | |
|----------------|--------------|--------|-----|-----|
| | IgA腎症 | 糖尿病性腎症 | 糖尿病 | 健常者 |
| SDS-PAGE法 | 6/6 | 4/4 | 6/9 | 0/5 |
| 微量アルブミン 検出法 | 5/6 | 4/4 | 0/9 | 0/5 |

【0076】SDS-PAGE法による分析の結果、IgA腎症において全例陽性であったが、微量アルブミン検出法では1例が陰性を示した。また、糖尿病では本法9例中6例が陽性であったのに対し、微量アルブミン検出法では全例陰性を示した。さらに、糖尿病腎症では本法および微量アルブミン検出法とも全例陽性であった。一方、健常者においては両方とも全例陰性であった。したがって、本法は腎疾患に対して従来の方法より感度が良く、特に糖尿病の腎症の早期発見に役立つことが判明した。

【図面の簡単な説明】

【図1】SDS-PAGE法による健常者5名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図2】SDS-PAGE法によるIgA腎症6名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図3】SDS-PAGE法による糖尿病性腎症4名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図4】SDS-PAGE法による糖尿病9名の免疫転写法のパターンの写真である。

【図5】等電点ゲル電気泳動-免疫転写法による健常者と糖尿病患者の尿中のヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の比較である。

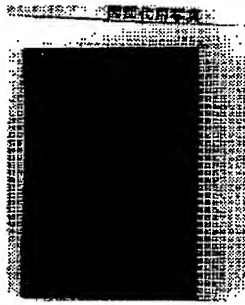
【図6】セルロースアセテート膜電気泳動-免疫転写法による健常者と糖尿病患者の尿中のヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の比較である。

【図7】セルロースアセテート膜電気泳動-免疫直接発色法による健常者と糖尿病患者の尿中のヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の比較である。

【図8】ヒトアルブミンをBrCNで分解したヒトアルブミン分解物の高速液体クロマトグラムである。

【図9】高速液体クロマトグラフィーによる健常入および各腎疾患患者の尿中のヒトアルブミン、ヒトアルブミン分解物の比較である。

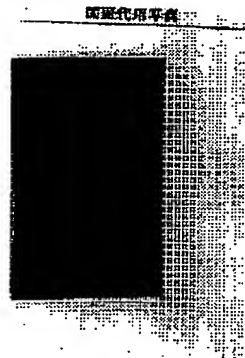
【図1】



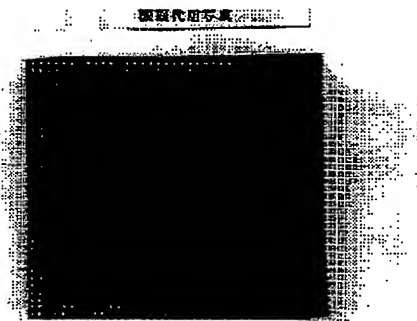
【図2】



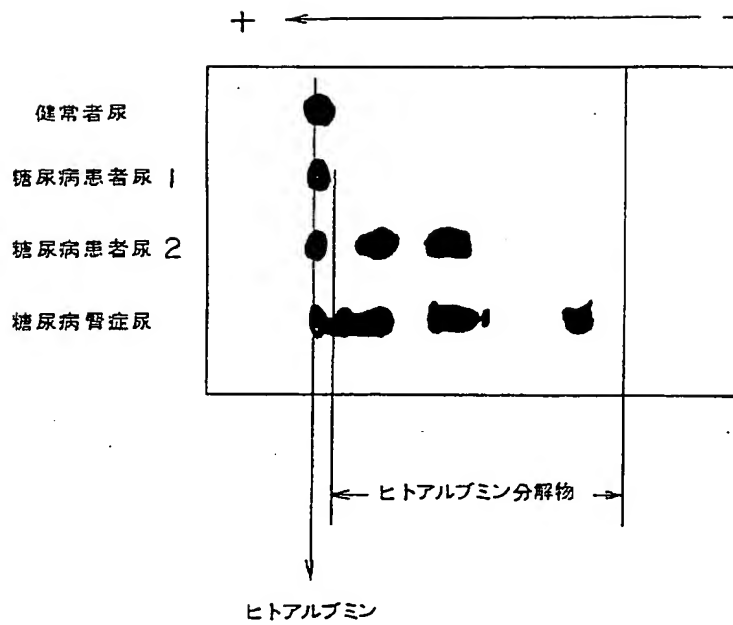
【図3】



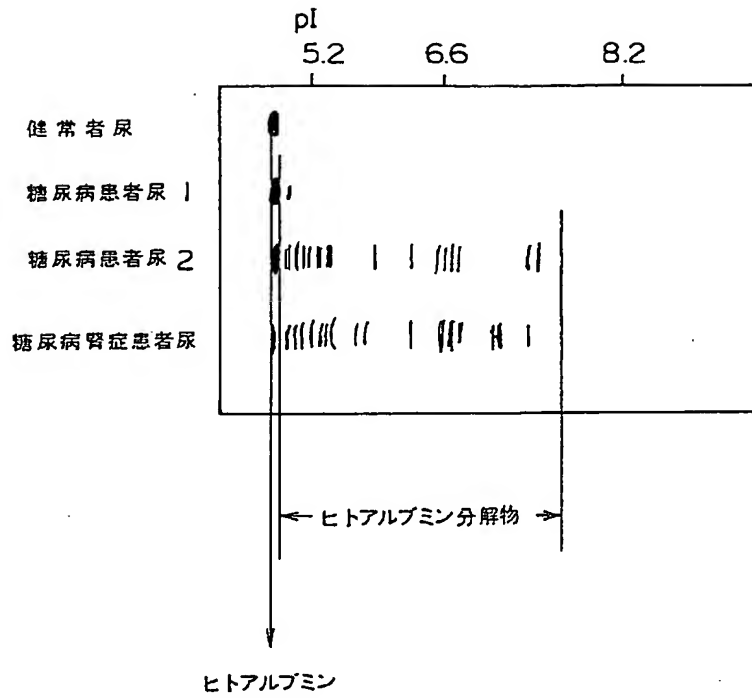
【図4】



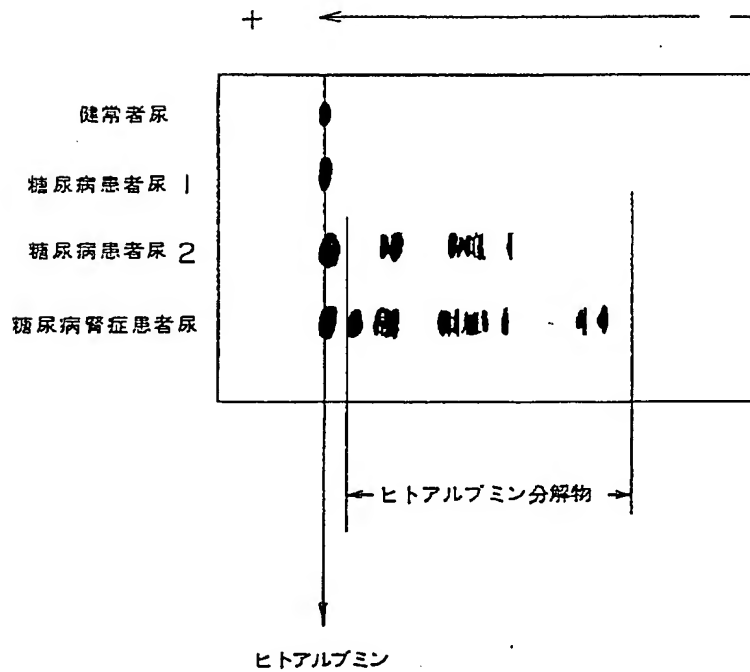
【図7】



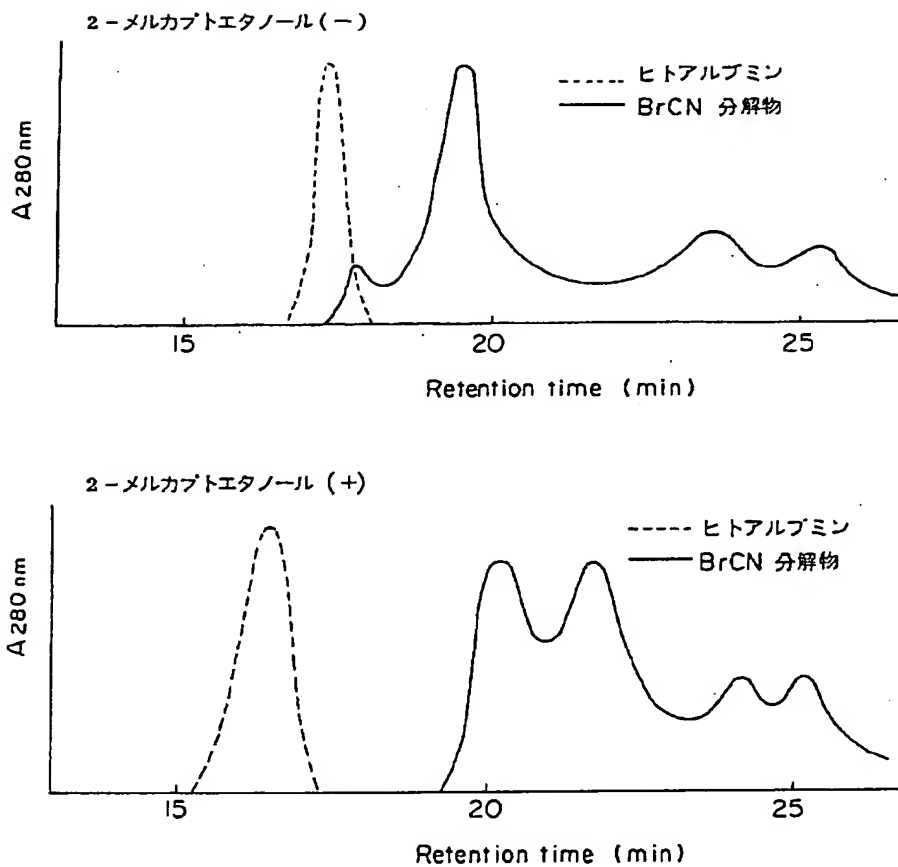
【図5】



【図6】



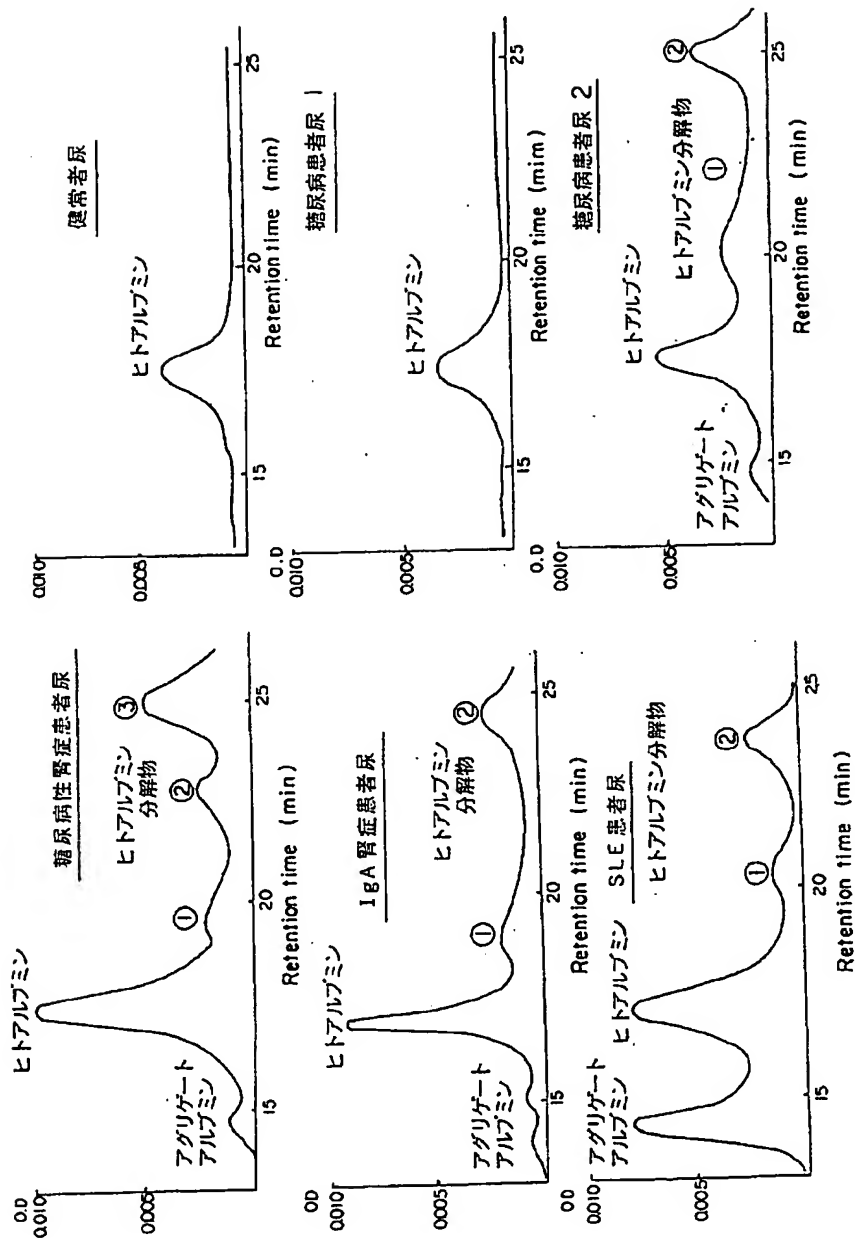
【図8】



TSK Gel G 3000SW を用いた溶出パターン

溶離液: 0.55M Glycine-HCl pH3.0 + 0.15M NaCl
+ 0.1% SDS

【図9】



【手続補正書】

【提出日】平成5年4月23日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】SDSポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE法）による健常者5名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図2】SDSポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE法）によるIgA腎症6名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図3】SDSポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE法）による糖尿病性腎症4名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図4】SDSポリアクリルアミド電気泳動法（SDS*

*-PAGE法）による糖尿病9名の免疫転写法のパターンを示す写真である。

【図5】等電点ゲル電気泳動-免疫転写法による健常者と糖尿病患者の尿中のヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の比較である。

【図6】セルロースアセテート膜電気泳動-免疫転写法による健常者と糖尿病患者の尿中のヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の比較である。

【図7】セルロースアセテート膜電気泳動-免疫直接発色法による健常者と糖尿病患者の尿中のヒトアルブミンおよびヒトアルブミン分解物の比較である。

【図8】ヒトアルブミンをBrCNで分解したヒトアルブミン分解物の高速液体クロマトグラムである。

【図9】高速液体クロマトグラフィーによる健常人および各腎疾患患者の尿中のヒトアルブミン、ヒトアルブミン分解物の比較である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.³

G01N 33/68

識別記号

庁内整理番号

7055-2J

FI

技術表示箇所

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**